

Vergleichende Charakterisierung von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten aus unterschiedlichen Kultivierungsverfahren

Harald Klein¹, Martina Anduleit¹, Monika Bornhak¹, Matthias Fischer¹, Uwe Gross², Bettina Löschner¹, Sven Nicol¹, Ingrid Reiter-Orwona³, Nadja Zyto¹ und Thomas Montag-Lessing¹

¹Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen, ²Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität, D-Würzburg, ³Institut für Medizinische Parasitologie der Universität D-Bonn

Zusammenfassung

Die Zucht und Stammhaltung von *Toxoplasma gondii* findet in der Ascitesflüssigkeit von intraperitoneal infizierten Mäusen statt, da derzeit nur diese Art der Parasitenvermehrung Toxoplasmen mit vollständigem Antigenbesatz garantiert. Ursächlich dafür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der Selektionsdruck, der durch die Wirtsabwehr auf die Parasiten ausgeübt wird. Die intraperitoneale Passage stellt für die Mäuse eine erhebliche Belastung dar und erfordert den Tod einer großen Anzahl von Tieren. Im Bereich der Diagnostika kann jedoch auf *T. gondii*-Antigen nicht verzichtet werden.

Ziel des Projektes ist es, alternative Techniken zur Bereitstellung von qualitativ hochwertigem *Toxoplasma*-Antigen zu entwickeln. Es ist gelungen, mit der im Rahmen des Forschungsprojektes etablierten Technik des PCR-Fingerprintings (RAPD-PCR; random amplified polymorphic DNA-Polymerase chain reaction) eindeutig zu zeigen, daß eine mittels unterschiedlicher Kultivierungsverfahren vermehrte Parasitenpopulation keiner klonalen Selektion unterliegt. Dies bedeutet, daß auf Grund der unterschiedlichen Bedingungen während der genannten Kulturmethoden kein bestimmter, zunächst nur einen geringen Anteil an der Gesamtpopulation ausmachender Teil von Parasiten einer bevorzugten Vermehrung unterliegt. Basierend auf diesem Ergebnis gibt es nun prinzipiell zwei Möglichkeiten der weiteren Vorgehensweise. Zum einen können die Bedingungen während der *in vitro* Vermehrung derartig verändert werden, daß der vom Wirt ausgehende Druck der Infektabwehr simuliert wird. Ein wesentlich erfolversprechenderer Ansatz scheint uns jedoch die gentechnische Herstellung von diagnostisch relevanten *Toxoplasma*-Proteinen zu sein.

Summary: Characteristics of Toxoplasma-gondii-tachyzoites from different culture systems

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan parasite of worldwide distribution. Parasites that harbour a complete antigenic profile, that is necessary for the serological diagnosis of human *Toxoplasma* infections, are provided by *in vivo* culture methods only. It seems that the host immune pressure is responsible for the expression of a total antigen pattern. Thus, in most laboratories the asexual proliferative stage of the parasite, the tachyzoite, is maintained by successive intraperitoneal passages in highly susceptible animals such as mice.

We would like to develop an *in vitro* method to provide sufficient amounts of high quality parasite antigen suitable for diagnosis of *Toxoplasmosis*. Using the RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-PCR) technique, we were able to show that during different culture conditions (*in vivo* and *in vitro* culture) the parasites undergo no clonal selection. That means the entire parasite population changes the protein expression pattern due to the *in vitro* culture conditions. Based on the result described previously the work could be continued as follows. One strategy could be to simulate the host immune pressure during the *in vitro* cultivation of the tachyzoites. A more convinced approach may be the production of recombinant parasite antigens useful for diagnosis of a *Toxoplasma* infection in human adults and newborns.

Keywords: *toxoplasma gondii*, antigen pattern, random amplified polymorphic DNA-PCR, recombinant parasite antigens

1 Entwicklungsgang von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein einzelliger, sich obligatorisch intrazellulär vermehrender Parasit, der in den Protozoenstamm Apikomplexa (Sporozoa) eingeordnet wird. Der Entwicklungszyklus des Parasiten, der einen fakultativen Wirtswechsel einschließen kann, ist in Abbildung 1 dargestellt. Der für alle apikomplexen Parasiten charakteristi-

sche Generationswechsel weist drei Phasen auf: eine ungeschlechtliche Vermehrungsphase, die Schizogonie, dann eine Phase der geschlechtlichen Differenzierung (Gamogonie) und schließlich die Sporogonie, eine weitere ungeschlechtliche Vermehrung, wobei aus der befruchteten Eizelle bewegliche, für den nächsten Wirt infektiöse Stadien (Sporozoit) entstehen.

Bei den durch Fäzes übertragenen Arten, wie z. B. *Toxoplasma gondii*, sind die Sporozoit

stets in resistente Dauerstadien, Oozysten bzw. Sporozysten, eingeschlossen, so daß sie im Freien außerhalb des Wirts lange überleben können. Der Entwicklungsgang von *Toxoplasma gondii* kann einwirtig sein. Die komplette Entwicklung läuft dann in allen drei Phasen in der Katze ab. Die Oozysten können nach der Sporulation im Freien dann weitere Katzen infizieren oder aber auch zahlreiche Zwischenwirte. Ist der Zyklus an fakultative Zwischenwirte gebunden, von denen

z.B. die Maus als natürliche Beute der Katze für die Verbreitung der Parasiten besonders wichtig ist, findet nur die geschlechtliche Differenzierung in der Katze statt, die so per Definition zum Endwirt für den Parasiten wird.

In den Zwischenwirten erfolgt in der akuten Phase zunächst eine starke ungeschlechtliche Vermehrung, besonders in Zellen des lymphatischen Systems. Diese Parasitenstadien werden als Tachyzoiten bezeichnet. Im weiteren Verlauf der Infektion bilden sich dann intrazellulär im Gewebe Zysten aus, vor allem im Gehirn und in der Muskulatur der Zwischenwirte. Die in den Zysten enthaltenen Parasiten bezeichnet man auch als Bradyzoiten. Dabei handelt es sich um Ruhestadien, die sowohl für die Katze, den Endwirt, als auch für andere Zwischenwirte infektiös sind. So kann sich z. B. der Mensch durch die orale Aufnahme von Oozysten aus der Katze, oder durch den Genuß von gewebezystenhaltigem Fleisch mit *Toxoplasma gondii* infizieren.

Aus humanmedizinischer Sicht ist eine Toxoplasma-Infektion in zweierlei Hinsicht von großer Bedeutung: Erstens führt eine Erstinfektion während der Schwangerschaft in ca. 50% der Fälle unbehandelt zur konnatalen Toxoplasmose des Kindes, zweitens kann es bei einer Immunsuppression eines chronisch infizierten Individuums zur Reaktivierung der Zysten und nachfolgend zu zerebraler oder disseminierter Toxoplasmose kommen.

2 Diagnostik von *Toxoplasma gondii*

Die Diagnostik einer Toxoplasma-Infektion beruht immer noch im wesentlichen auf serologischen Methoden, die es erforderlich machen, eine ausreichende Menge an qualitativ hochwertigem Antigen bereitzustellen. Dies kann derzeit nur über die Kultivierung des Parasiten im Intra-peritoneal-Bereich von Mäusen gewährleistet werden. Existierende *in vitro* Systeme, wie z. B. die Vermehrung in murinen Makrophagen-Zelllinien sind dafür ungeeignet, da es mit hoher Wahrscheinlichkeit aufgrund des fehlenden Immundrucks zu einer Veränderung im Antigenexpressionsmuster des Parasiten kommt. Ziel des Projektes ist es, die auf verschiedene Arten vermehrten Parasiten mittels einer breiten analytischen Methodenpalette (SDS-PAGE, Western Blot, PCR-Fingerprinting) zu charakterisieren und nach-

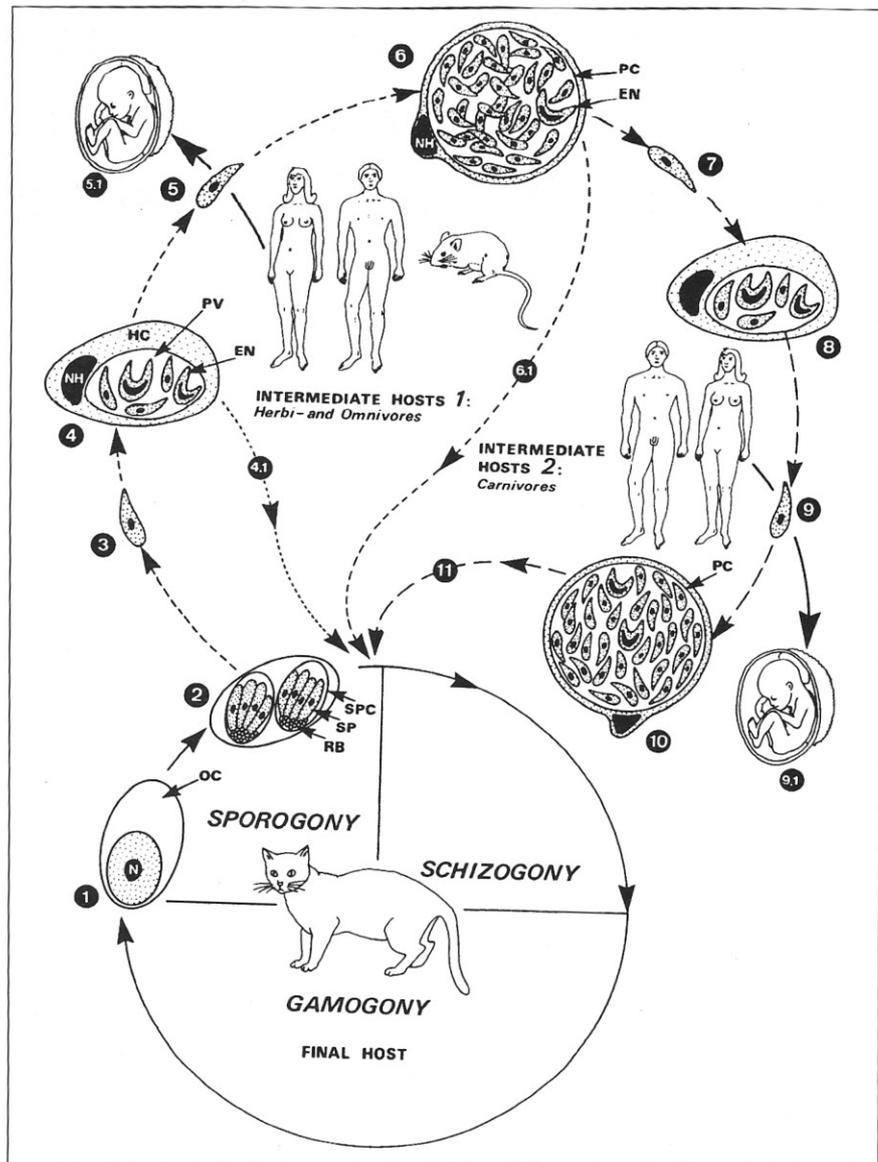


Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii*.
 EN, Zellteilung durch Endodyogenie; HC, Wirtszelle; N, Nukleus; NH, Wirtszellnukleus; OC, Oozyste; PC, primäre Zystenwand; PV, parasitophore Vakuole; RB, Restkörper; SP, Sporozoiten; SPC, Sporozyste.
 1: Von der Katze ausgeschiedene unsporulierte Oozyste
 2: Sporulation (erfolgt im Freien)
 3: Sporozoit (infektiöses Stadium für die Katze und Zwischenwirte Typ 1)
 4: Endodyogenie (Entstehung von Pseudozysten, die Tachyzoiten enthalten)
 4.1: Infektiöse Tachyzoiten für die Katze und weitere Zwischenwirte
 5: Freie (extrazelluläre) Merozoiten nach Verlassen der Pseudozyste
 6: Bildung von Gewebezysten, die Bradyzoiten enthalten
 6.1: Infektion der Katze über die Aufnahme von Gewebezysten Typ 1
 7-10: Infektion durch Gewebezysten der Zwischenwirte Typ 2 mit anschließender Gewebezystenbildung (identisch mit 3-6)
 9.1: Diaplazentarer Übertragungsweg von *Toxoplasma gondii* auf den Fötus während einer Primärinfektion im Verlaufe einer Schwangerschaft (kongenitale Toxoplasmose)
 11: Infektion der Katze über die Aufnahme von Gewebezysten Typ 2

folgend alternative Techniken zu entwickeln, die es ermöglichen, Toxoplasma-Antigenen mit einer dem murinen System vergleichbaren Qualität bereitzustellen.

3 *In vitro* Züchtung von *Toxoplasma gondii*

Um für die genannten Untersuchungen eine ausreichende Anzahl an Parasiten

bereitzustellen, wurde zunächst die Kultivierung von *Toxoplasma gondii* in der Maus bzw. in einer murinen Makrophagen-Zelllinie etabliert. Für die unterschiedlichen Antigenqualitäten von *in vivo* und *in vitro* gezüchteten Parasiten gab es zwei theoretische Ansätze, die in folgender Form in der Fachwelt seit Jahren diskutiert wurden. Zum einen bestand die Möglichkeit der klonalen Selektion, d.h. daß auf Grund der unterschiedlichen Bedingungen während der genannten Kulturmethoden nur ein bestimmter, zunächst allerdings nur einen geringen Anteil an der Gesamtpopulation ausmachender Teil von Parasiten einer bevorzugten Vermehrung unterliegt. Als Alternative wäre ein auf die jeweiligen Zuchtbedingungen zurückzuführendes verändertes Antigenexpressionsmuster denkbar.

4 PCR-Fingerprinting

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde im Rahmen des Projektes die Methode des PCR-Fingerprinting eingeführt. Bei der von uns etablierten Technik, die auch als RAPD-PCR (*random amplified polymorphic DNA-PCR*) bezeichnet wird, werden bezogen auf die Nukleotidsequenz zufällig ausgewählte Oligonukleotide als *Primer* für die anschließende PCR-Reaktion eingesetzt. Diese *Primer* hybridisieren aufgrund ihrer im Verhältnis zur Genomgröße des Parasiten kurzen Sequenz an zahlreiche komplementäre Abschnitte innerhalb der *Toxoplasma*-DNA, so daß nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsprodukte ein komplexes Bandenmuster entsteht. Vergleicht man nun Genome unterschiedlicher Herkunft, unterscheidet sich dieses Muster mehr oder weniger stark in Abhängigkeit von den Polymorphismen bezüglich der *Primer*-Bindestellen. In Abbildung 2 sind entsprechende *Fingerprints* (Spur 2 jeweils von *in vivo*, Spur 3 von *in vitro* kultivierten Toxoplasmen), die wir mit fünf verschiedenen *Primern* erhalten haben, exemplarisch dargestellt. Als Kontrolle wurde jeweils DNA von murinen Milzzellen (Spur 1) bzw. die DNA der murinen Makrophagenlinie P388 (Spur 4) in die PCR eingesetzt. Diese Kontrollen sind von großer Bedeutung, da es nahezu unmöglich ist, die Parasiten aufgrund ihrer obligat intrazellulären Vermehrung frei von Wirtszellen zu isolieren. Bedingt durch die

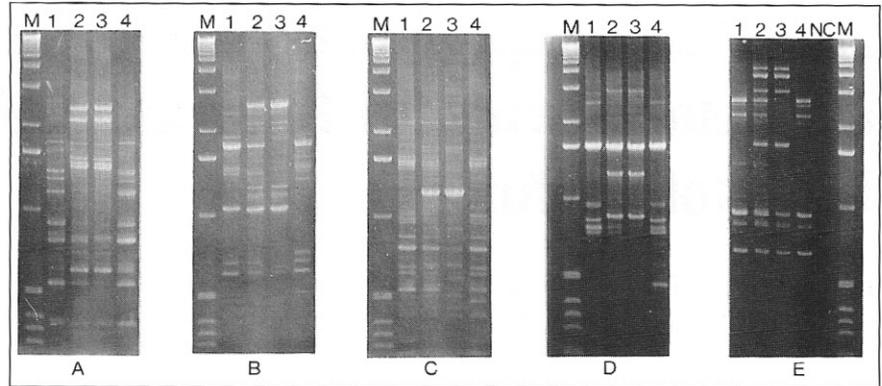


Abbildung 2: PCR-Fingerprinting von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten aus unterschiedlichen Kultivierungsverfahren.

M: Molekulargewichtsmarker

NC: Negativ-Kontrolle

In Spur 2 und 3 sind die Reaktionsprodukte von DNA-Isolaten aus *in vivo* bzw. *in vitro* vermehrten Tachyzoiten aufgetragen.

Als Kontrollen wurden in den Spuren 1 jeweils murine Milzzell-DNA, in den Spuren 2 DNA aus der murinen Makrophagenlinie P388 in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Folgende *Primer* wurden für das PCR-Fingerprinting eingesetzt:

A: B12: 5'-CCTTGACGCA-3'

B: B13: 5'-TTCCCCGCT-3'

C: B5: 5'-TGCGCCCTTC-3'

D: F6: 5'-GGGAATTCGG-3'

E: T3B: 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'

unterschiedlichen Genomgrößen von Wirtszellen und Parasiten, machen sich daher bereits geringste Kontaminationen mit Wirtszell-DNA bei der PCR negativ bemerkbar. Identische Banden, die sowohl beim *Fingerprint* von Parasiten- als auch Wirtszell-DNA auftreten, sind deshalb bei der Auswertung zu vernachlässigen. Insgesamt zeigt sich jedoch, daß die unterschiedlichen Kultivierungsverfahren der Parasiten keinen Einfluß auf das erhaltene Bandenmuster haben. Somit kann eine klonale Selektion beim Übergang von der *in vivo* zur *in vitro* Vermehrung ausgeschlossen werden. Der veränderte Antigenbesatz der Toxoplasmen ist somit ausschließlich auf eine einheitliche Veränderung im Proteinexpressionsmuster der Gesamtparasitenpopulation als Folge der *in vitro* Vermehrung zurückzuführen.

5 Weiteres Vorgehen

Basierend auf diesem Ergebnis gibt es nun prinzipiell zwei Möglichkeiten der weiteren Vorgehensweise. Zum einen kann versucht werden, die Bedingungen während der *in vitro* Vermehrung derartig zu verändern, daß der vom Wirt ausgehende Druck der Infektabwehr simuliert wird. Ein wesentlich erfolgversprechenderer Ansatz scheint uns jedoch die gentechni-

sche Herstellung von diagnostisch relevanten *Toxoplasma*-Proteinen zu sein, die für die serologische Diagnostik weitestgehend den natürlichen Antigenen entsprechen müssen.

Korrespondenzadresse

Nadja Zyto
Paul-Ehrlich-Institut
Fachgebiet 1/3
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D-63225 Langen
E-mail: zyto@em.uni-frankfurt.de

